

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平10-507183

(43) 公表日 平成10年(1998) 7月14日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	F I	
A 6 1 K 38/27	A E F	A 6 1 K 37/36	A E F
9/08		9/08	E
47/42		47/42	J
// A 6 1 K 9/19		9/14	E

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 20 頁)

(21) 出願番号 特願平8-512863
 (86) (22) 出願日 平成7年(1995)10月13日
 (85) 翻訳文提出日 平成9年(1997)4月10日
 (86) 国際出願番号 P C T / D K 9 5 / 0 0 4 1 0
 (87) 国際公開番号 W O 9 6 / 1 1 7 0 4
 (87) 国際公開日 平成8年(1996)4月25日
 (31) 優先権主張番号 0 8 / 3 2 2 , 8 3 8
 (32) 優先日 1994年10月13日
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)
 (31) 優先権主張番号 0 8 / 4 5 5 , 8 8 6
 (32) 優先日 1995年5月31日
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 ノボ ノルディスク アクティーゼルスカ
 ブ
 デンマーク国, デーコー-2880 バグスバ
 エルト, ノボ アレ (番地なし)
 (72) 発明者 セレンセン, ハンス ホルメガールト
 デンマーク国, デーコー-2830 ビラム,
 ヨアシム レンナウスバイ 21
 (74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 成長ホルモンおよびロイシンを含んでなる医薬製剤

(57) 【要約】

添加剤又は緩衝物質として成長ホルモンおよびロイシン
 を含んでなる医薬製剤は、ペプチド結合の脱アミド化、
 酸化および分解に対し極めて高い安定性を示す。生成物
 の安定性は、室温で凍結乾燥状態で又は溶解しているか
 又は再溶解する製剤の形でその保存および船積みを許容
 する。

【特許請求の範囲】

1. 成長ホルモンおよびロイシンを含んでなる医薬製剤。
2. 前記医薬製剤が、緩衝水性溶液の形態にある、請求の範囲第1項記載の医薬製剤。
3. pH値が、約2～約8の間隔内の値に調節されている、請求の範囲第1又は2項記載の医薬製剤。
4. ロイシンの濃度が、100mMまでである、請求の範囲第1～3項のいずれか1項に記載の医薬製剤。
5. 塩および／又は賦形剤を更に含んでなる、請求の範囲第1～4項のいずれか1項に記載の医薬製剤。
6. 成長ホルモンが hGHである、請求の範囲第1～5項のいずれか1項に記載の医薬製剤。
7. 請求の範囲第1項記載の医薬製剤の製造方法であって、成長ホルモンを、ロイシンを含んでなる溶液に添加することを含んでなる、前記方法。
8. 成長ホルモンの製剤の安定化方法であって、該製剤を安定化するために有効なロイシンの量を添加することを含んでなる、前記方法。
9. ロイシンを含んでなる溶液を、脱イオン水中にロイシンを溶解することによって得ることを含んでなる、請求の範囲第7又は8項記載の方法。
10. ロイシンを含んでなる溶液が、またベンジルアルコールを含んでなる、請求の範囲第1～9項のいずれか1項に記載の方法。
11. 前記製剤のpH値を、約2～約8に調整することを更に含んでなる、請求の範囲第1～10項のいずれか1項に記載の方法。
12. 更に塩を添加することを含んでなる、請求の範囲第1～11項のいずれか1項に記載の方法。
13. 更に賦形剤を含んでなる、請求の範囲第1～12項のいずれか1項に記載の方法。
14. 成長ホルモンおよびロイシンを含んでなる溶液を、容器に充填し次いで該溶液を凍結乾燥することを含んでなる、請求の範囲第1～13項のいずれか1項に

記載の方法。

15. 成長ホルモンによって作用され得る患者の疾患の治療方法であって、該疾患を治療するために有効である、請求の範囲第1～6項のいずれか1項に記載の医薬製剤の量を投与することを含んでなる、前記方法。

16. 本明細書で開示した新規特徴又はその特徴の組み合わせ。

【発明の詳細な説明】

成長ホルモンおよびロイシンを含んでなる医薬製剤

発明の分野

本発明は、成長ホルモンを含んでなる安定化された医薬製剤、該製剤の製造方法、および成長ホルモンから成る製剤を安定化するためにロイシンの使用に関する。

発明の背景

ヒトのおよび普通の家畜動物のホルモンは、下垂体前葉で合成されそして分泌される、約 191個のアミノ酸から成るタンパク質である。ヒト成長ホルモンは、191個のアミノ酸から成る。

成長ホルモンは、身体の成長の調節におけるのみならず、タンパク質、炭水化物および脂質の代謝の調節に関与する重要なホルモンである。成長ホルモンの主効果は、成長を促進することである。

成長ホルモンによって影響される生体には、骨格、結合組織、筋肉、および内臓例えば肝、小腸および腎が含まれる。

今日例えばヒト成長ホルモン(hGH)および Met-hGH を工業的規模で生ぜしめる組換え工学および成長ホルモン遺伝子のクローニングが発達するまで、ヒト成長ホルモンは、ヒトの孔体の下垂体から抽出により得ることができるのみであった。成長ホルモンの極めて限られた供給のため、小人症の治療に対し小児期および青春期に対する使用が限定されていた、たとえその使用が、特に(成長ホルモン欠損症、正常に短い身長およびターナー(Tarner)症候群による)、短い身長、成人における成長ホルモン欠損症、不妊の使用、やけど、創傷治ゆ、および偽関節の治療に対し並びにヒトの消費に対

して殺されるべき動物中の脂肪中の割合を減少するため提案されてきたが。

成長ホルモンの医薬製剤は、不安定の傾向にある。分解生成物、例えば脱アミド化又はスルホキシド化生成物およびダイマー又はポリマー形は、特に成長ホルモンの溶液中で生じる。

hGHの優先的分解は、1) 種々の量の L-aspart-hGH, L-iso-aspart-hGH, D-aspart-hGH

、および D-iso-asp-hGHを形成するため直接加水分解により、又は環状スクシンイミド中間体を介しての脱アミド化 (Y.-C. J. Wang and M. A. Hanson. Parenteral Formulations of Proteins and Peptides: Stability and Stabilizers. J. Parenteral Science and Technology 42 (Suppl.) (1988) 53-525 ; M. C. Manning, K. Patel, R. T. Borchardt. Stability of Protein Pharmaceuticals. Pharmaceutical Research 6 (11) (1989) 903-918 ; および B. A. Johnson, J. M. Shirokawa, W. S. Hancock, M. W. Spellman, L. J. Basa and D. W. Asward. J. Biol. Chem. 264, 1462-71 (1989).) 並びに14位および 125位におけるメチオニン残基の酸化である (L. C. Teh et al., J. Biol. Chem., 262, 785-794 (1987) ; G. W. Becker et al., Biotech. Appl. Biochem., 10, 326-337 (1988) ; R. A. Houghten et al., Arch. Biochem. Biophys., 178, 350-355 (1977) ; R. M. Rigginn et al., Anal. Biochem. 167, 199-209 (1987) ; P. Gellerfors et al., Acta Paediatr. Scand (suppl), 370, 93-100 (1990) ; M. J. Kaufman, Pharm. Res., 7 (3) 289-292 (1990).) 凍結乾燥状態で並びに溶液中の hGHの主分解産物は、脱アミド化hGH である。脱アミド化は、149位の Asnで生起しそして少程度152位で生起する。hGHはまた、14位および 125位で、特に溶液中で相当容易に酸化される。 (L. C. Teh et al., J. Biol. Chem., 262, 785-794 (1987) ; G. W. Becker et al., Biotech. Appl. B

iochem., 10, 326-337 (1988) ; R. A. Houghten et al., Arch. Biochem. Biophys., 178, 350-355 (1977) ; R. M. Rigginn et al., Anal. Biochem., 167, 199-209 (1987) ; P. Gellerfors et al., Acta Paediatr. Scand (suppl), 370, 93-100 (1990))。

スルホキシドを形成する溶液中での hGHの酸化は、通常、製剤中に溶解する酸素に起因する。蒸留水で酸素の溶解性は、約 $200 \mu\text{M}$ (9) である。4 IU/mlを含んでなる製剤中の hGHの濃度は、60nMの hGHに相当する 1.3mg/mlであるので、通常の貯蔵条件下で酸素は hGHの酸化に対する化学量論的量の約 300倍過剰で存在するであろう。

タッピング(tapping)しそして製剤を充てんする前に緩衝剤を脱ガスすること

により問題を解決しようとすることは可能でなかった。

今日、次のようには考えられていない；すなわち、hGHの脱アミド化形および酸化形は、毒性又は改変された生物学的活性又はレセプター結合性を有するが、しかしスルホキシドの配座安定性が、天然hGHと比較して減少しているという効果に対する徴候がある。

hGHを含んでなる安定した、溶解製剤の開発のため、脱アミド化の速度とスルホキシドの形成並びに反応を制御する手段を知ることは重要である。

分解の動力学は、温度、pHおよびhGH製造中の種々の添加剤又は補助剤に依存する。

不安定さの段に、成長ホルモンは、今日、凍結乾燥されそしてその成長ホルモンが分解を最少化するための使用に際し再構成されるまで4℃で凍結乾燥形で保存される。

hGHを含んでなる凍結乾燥製剤は、今日疾患により再構成され次いで4℃で14日までの期間使用中溶液として保存され、この間幾ら

かの分解は起こるのであろう。

更に、凍結乾燥成長ホルモンの再構成プロセスは、患者に困難さを与える傾向にある。

従って、製造者から薬局までの系列は、2年までの長い保存期間を許容する、制御された低温度、例えば4℃で製剤を取り扱うのに適合している。

しかし、自己投薬のためのペンシステムの長期間の使用並びに使用の拡大分野は、次の製剤を要求する；すなわち、その製剤は、「十分な」冷却が必ずしも得られないような条件下、末端使用者にとって十分に長い期間安定である。

好ましくは、製剤は約1カ月間凍結乾燥状態で末端使用者にとって安定であるべきでありそして追加的にカートリッジの目的とする使用期間ペン(pen)装置内で再構成された状態で1カ月間安定であるべきである。

従って、比較的高温度で使用期間凍結乾燥状態で安定でありそして追加的に比較的高温度で使用期間溶液中で安定である成長ホルモンのより安定な製剤に対する必要性が存在する。そのような安定化は、次のような場合に重要である、すな

わち、治療すべき患者に関し、クリニックから家庭まで成長ホルモンの投与を移動させる場合であり、そこでは最適保存は前記の如く得られないかもしれない。

更に、ペン装置を有する使用者に、成長ホルモンの投与のパターンのシフトは、患者によって遂行されるべき取扱いを促進するために成長ホルモンを含んでなる安定した溶解製剤を要求する。成長ホルモンを含んでなる安定な溶解製剤は、製剤の再構成を避けることのできる患者によって使用されるペン装置に適合するカートリッジの形態で使用できるように製造でき、従って凍結乾燥された製剤、再構成のための適当なビヒクル並びに製剤の殺菌の再構成のための

殺菌装置の入手において存在する必要はないであろう。

安定な理由から、製剤の使用直前に凍結乾燥された製剤の再構成を避けることが又望ましいであろう。

更に、成長ホルモン製剤の製造において凍結乾燥工程を避けることも適当であろう。凍結乾燥は、時間がかかりそしてコスト高のプロセスでありそしてしばしば凍結乾燥器の限られた能力のため製造においてしばしば“ボトルネック (bottleneck)”でもある。

従って、溶解された hGH 製剤が、保存期間中そして1 カ月までの使用期間中安定であるようにさせるため、分解プロセスの速度を減少する必要がある。

hGH を安定化させるための従来を試みは、ダイマーの形成を防止するのに十分に成功してこなかった。ダイマー形成に係わる問題は、例えばベッカー、Biotec hnology and Applied Biochemistry 9, 478 (1987) に記載されている。

国際公開W089/09614 およびオーストラリア特許出願 30771/89は、ヒト成長ホルモン、グリシンおよびマニトールを含有する安定な医薬製剤である。そのような製剤は、凍結乾燥状態中並びに再構成後の使用期間中、正常な加工および貯蔵中、改善された安定性を示す。

公開されたヨーロッパ特許出願303746は、以上の内容を開示する；すなわち；動物成長ホルモンは、種々の安定剤で安定化され、その結果不溶物が減少しそして水性環境下で可溶性の活性が保たれ、そのような安定剤には、幾つかのポリオール、アミノ酸、生理学的pHで荷電した側基を有するアミノ酸のポリマーおよび

塩素塩が含まれる。ポリオールは、非還元糖、糖アルコール、糖酸、ペンタエリトリール、ラクトース、水溶性デキストランおよびフィコリ；アミノ酸は、グリシン、サッカロース、リンス又はその塩、セリン、

アルギニン又はその塩、ベタイン、N, N-ジメチル-グリシン、アスパラギン酸又はその塩、グルタミン酸又はその塩；生理的pHで荷電した側鎖を有するアミノ酸のポリマーは、ポリリシン、ポリアスパラギン酸、ポリグルタミン酸、ポリアルギニン、ポリヒスチジン、ポリオルニチンおよびその塩から選ばれ；そして塩素誘導体は、塩化コリン、コリン土水素シトラート、コリンビタルトラート、コリンピカーボネート、トリコリン、シトラート、コリンアスコルベート、コリンボラート、コリングルコナート、コリンホスファート、ジ（コリン）スルファートおよびジコリンムカートから成る群から選ばれる。

米国特許 4,917,685は、ヨーロッパ特許303746に言及されるものと同じ安定剤を用いて安定化される成長ホルモンを含んでなる植め込むことが意図されたデリバリーデバイスを開示する。

ヨーロッパ公開特許 374,120は、hGHおよび三個の水酸基を有するポリオールを含んでなる、安定化された製剤を開示する。グリセロールおよびトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンが、言及されている。更に、ポリオールと共に緩衝剤としてヒスチジン塩酸塩の存在が開示されている。

国際公開W093/12811 は、凍結乾燥粉末又はアスパラギンを含んでなる水性溶液の形態で成長ホルモンの安定化製剤を開示する。

国際公開W093/12812 は、凍結乾燥粉末又はヒスチジンを含んでなる水性溶液の形態で成長ホルモンの安定化製剤を開示する。

国際公開W093/19776 は、緩衝物質として、ホスファート緩衝剤を含んでなる製剤よりもより安定であるシトラートを含んでなる成長ホルモンを含んでなるタンパク質製剤を開示する。製剤は又、アミノ酸、例えばグリシンおよびアラニンおよび／又はマニトール又は他の糖アルコールおよび／又はグリシンおよび／又は他の炭水化

物および所望の防腐剤例えばベンジルアルコールを含有することが できる。

国際公開W094/03198 は、ヒト成長ホルモン、緩衝剤、非イオン界面活性剤、および所望により、中性塩、マニトール、又は防腐剤を含有する安定な水性製剤を開示する。

ヨーロッパ公開特許 106,608は、安定剤として、サッカリド又は中性アミノ酸を用い、グロブリンの安定化溶液を開示する。

米国特許 4,537,769は、バリンを含む種々のアミノ酸によりインフルエンザウイルスからのノイラミニダーゼに対する安定化効果を開示する。

米国特許 4,915,945は、糖（例えばスクロース）、糖アルコールおよび／又はアミノ酸を用い、ヒトプラズマC1不活性物質タンパク質の安定性を開示する。

本発明の簡単な記載

今や、驚くべきことに以下の内容が見出された、すなわち添加剤としてロイシンを含むヒト成長ホルモンの製剤は、脱アミド化に対し極めて高い安定性を示す。生成物の安定性は、凍結乾燥中又は溶解もしくは再溶解した製剤の形で保存および船積みを許容する。

本発明の医薬製剤は、適当な方法で、例えば非経口又は経口投与により粘膜；例えば点鼻投与により投与するために製剤化できる。

医薬製剤は、バイアル又はカートリッジ又は他の適当な容器例えば精製シュリンジ又はペン装置内に含まれる用量の形で存在してもよい。

従って、本発明の製剤は、通常のビヒクル、例えば蒸留水又は注射用水を用い後に再構成されるべき凍結乾燥粉末の形で又は成長ホルモンを含んでなる溶液の形で存在することができる。そのような

ビヒクルは、通常の防腐剤例えばm-クレゾールおよびベンジルアルコールを含むことができる。

本発明の好ましい態様は、ロイシンを含んでなりそして更に成長ホルモンの緩衝化された水性溶液の形で担体を含んでなる成長ホルモンの医薬製剤の形である。そのような製剤は、直ちに使用できる形態でありそして何ら相当に分解することなく水性溶液として保存されそして船積みされ得る。

成長ホルモンの溶液中で用いられるべき緩衝剤は、例えばヒスチジン、シトラート、タルトラート又はホスファート緩衝剤である。

安全性の理由から、溶液のpHは好ましくは約2～約8の値に、より好ましくは5～7のpHに、特に約6.8のpHに好ましく調節される。

安定化効果を得るため、ロイシンが、約0.1mMから100mMまでの量で、より好ましくは約5mMの量で好ましく加えられる。

本発明の医薬製剤は、更に稠度を調節するための塩および所望によりそのプロセスを、例えば凍結乾燥使用前に製剤を再構成するとき凍結乾燥製剤の急速でかつ完全な溶解促進するための賦形剤を更に含むことができる。

賦形剤は、二糖類、例えばラクトース、トレハロース、およびスクロース、糖アルコール例えばソルビトール、又はマニトール、多糖例えばデキストラン（商標）製品、例えばデキストラン（商標）40、デキストラン（商標）70又はデキストラン（商標）75、およびフィコール（商標）として商品化されているポリマー並びに多価アルコール例えばポリエチレングリコール又はポリビニルアルコール又はこれらの二>又は三>の組み合わせから選ぶことができる。

医薬製剤は、成長ホルモンを、バリンを含む溶液に、好ましくは0.1mM～100mM、より好ましくは約1～10mM、好ましくは2～6mM

、最も好ましくは約3～5mMの量で加えることにより製造できる。成長ホルモンは、固体形で又は緩衝溶液例えばヒスチジン、シトラート、タルトラート又はホスホラート緩衝液中に存在することができる。一つの態様において、溶液は容器に充填されそして凍結乾燥される。

本発明方法の一つの態様において、任意の塩および賦形剤が加えられ、しかる後、溶液を容器に充てんしそして凍結乾燥する。

更に本発明の別の面は、成長ホルモンの安定化製剤の製剤化に対するロイシンの使用に関する。

本発明に関連して、「成長ホルモン」は、全ての起源例えば、鳥、牛、馬、羊、豚、サケ、マス又はマグロ成長ホルモン、好ましくは牛、ヒト又は豚成長ホルモンであってよく、ヒト成長ホルモンが最も好ましい。本発明に従って用いられ

る成長ホルモンは、例えば常法により下垂体を抽出することにより天然源から単離された天然成長ホルモンであるか、又はセンセン等、Biotech and Bioeng. 36, 1-11 (1990) に記載の如く組換え法により製造された成長ホルモンであってよい。「成長ホルモン」は又、成長ホルモン（ここにおいて1以上のアミノ酸残基が欠損している）；その類似体（ここにおいて、天然分子中の1以上のアミノ酸残基は別のアミノ酸残基、好ましくは天然のアミノ酸残基により置換されており、但し置換が何らの不都合な効果例えば抗原性又は減少せしめられた作用を有しない限りである）；又は例えば Met-hGH の如きN-又はC-末端伸長を有するその誘導体の地形の形であってよい。好ましい成長ホルモンは、ヒト成長ホルモン（hGH）である。

成長ホルモンの語句「用量」は、投与レジメにおいて治療的効果を与える量を意味する。ここにおける製剤は、直ちに使用できる製剤を基準にして、少なくとも約 0.1mg/ml、好ましくは約10mg/ml

まで、好ましくは約 1 mg/ml～約40mg/ml、より好ましくは約 1 mg/ml するように製造される。下垂体低下小人症を煩うヒトに投与するこれらの組成物の使用に対し、これらの製剤は、意図される治療に対し今日考えられている用量生活規則に相当する、約 0.1mg/ml～約10mg/mlを含有する。濃度範囲は、本発明に対し重要でなくそして投与を管理する医者によって変化し得る。

本発明に従って用いられるべきロイシンは、好ましくは天然 α ロイシンである。アミノ酸は L 又は D アミノ酸であるか又はそれらの混合物であってよい。

本発明に関連して、「高安定性」が、製剤がホスフェート緩衝剤を含んでなる通常の製剤よりもより安定でありそして好ましくは安定剤としてヒスチジンを含んでなる対応する製剤と同等に好ましくは安定であるとき、得られそしてここにおいて hGH の脱アミド化が、W093/12812 において開示されたホスフェート緩衝剤として比較して数20～30%だけ減少している。

本発明方法で用いられる溶剤は、水、アルコール、例えばエチル、n-プロピル又はイソプロピル、ブチルアルコール又はこれらの混合物であってよい。溶剤は、防腐剤例えばm-クレゾール又はベンジルアルコールを含んでいてもよい。

発明の詳細な記載

本発明を次の実施例により詳しく説明するが、この例は本発明を例示する。実施例は添付の請求の範囲で定義される本発明の範囲を限定するものと考えてはならない。

実施例

例 1

脱アミド化の減少

脱アミド化の速度を、pH6.8のヒスチジンと比較して、5mMのL-ロイシンおよびD-ロイシンの存在下、pH6.8で4mg/mlのhGHを含んでなるhGH製剤に対し37℃で調べた。

hGH製剤を、10mMのアミノ酸溶液2mlに8mgのhGHを溶解することによって調製した。従って、2mlの3.0%ベンジルアルコールを添加し、4mg/mlのhGH、5mMのD-ロイシン又はL-ロイシン、1.5%のベンジルアルコール、pH6.8(HCl又はNaOHを加えて調節)の最終製剤を得た。

下記の表で述べられているhGH製剤を37℃で7日間、そして溶離剤として尿素を用いIE-HPLCにより脱アミド化hGHの含量に対し分析した。結果を次の表に示す。

表 1

製 剤	pH開始／pH 終了／％ デスアミド	脱アミドhGH の修正 された含量*	Hisと比較された デスアミド hGHの含量
L-ロイシン	6.7/6.6/15.3	16.8	97
D-ロイシン	6.7/6.7/16.6	17.6	102
ヒスチジン	6.7/6.8/16.8	17.3	100

*デスアミドは、6.8 から0.1pH 単位偏差当たり1％だけ修正されている。

出発物質中の脱アミド化hGHの含量は、2.0%であった：

前記表から、以下の内容が明らかである；すなわち、ホスフェート緩衝剤と比

較してD-ロイシン又はL-ロイシンを添加することにより、hGHの脱アミド化は25~30%だけ減少する（ヒスチジンと比較して、少なくとも安定である、注上記W093/12812）。

前記結果は、以下の内容を示している；すなわち脱アミド化の速度は、100mMまで、好ましくは約5mMまでの低含量でL-ロイシン又はD-ロイシンを添加することによって減少する。脱アミド化の速度は、ホスフェート緩衝剤をL-ロイシン又はD-ロイシンで置換することにより30%以上減少し得る。

防腐剤としてベンジルアルコールを使用すると、脱アミド化の速度に何ら影響しないように思われる。

例2

脱アミド化の減少

脱アミド化の速度を、pH6.8のヒスチジンと比較して、5mMのL-ロイシンの存在下、pH6.8で4mg/mlのhGHを含んでなるhGH製剤に対し37℃で調べた。

hGH製剤を、10mMのアミノ酸溶液2mlに8mgのhGHを溶解することによって調製した。従って、2mlの3.0%ベンジルアルコールを添加し、4mg/mlのhGH、5mMのD-ロイシン又はヒスチジン、1.5%のベンジルアルコール、pH6.8(HCl又はNaOHを加えて調節)の最終製剤を得た。

下記の表で述べられているhGH製剤を37℃で7日間、そして溶離剤としてアセテートを用いIE-HPLCにより脱アミド化hGFの含量に対し分析した。結果を次の表に示す。

表 2

製 剤	pH開始 ／ pH 終了	脱アミド hGHの修正 含量*	Hisと比較された 脱アミド hGHの含量
5mM L-ロイシン	6.8/7.0	11.8	95
5mM L-ヒスチジン	6.9/6.9	12.4	100
Na ₂ HPO ₄	6.9/6.9	16.5	133

* デスアミドは、6.8 から0.1pH 単位偏差当たり1%だけ修正されている。

出発物質中の脱アミド化hGH の含量は、2.0%であった：

前記表から、以下の内容が明らかである；すなわち、ホスフェート緩衝剤と比較してロイシンを添加することにより、hGH の脱アミド化は25～30%だけ減少する（ヒスチジンと比較して、少なくとも安定である、注上記W093/12812）。

前記結果は、以下の内容を示している；すなわち脱アミド化の速度は、100mMまで、好ましくは約5mMまでの低含量でロイシンを添加することによって減少する。脱アミド化の速度は、ホスフェート緩衝剤をロイシンで置換することにより30%以上減少し得る。

防腐剤としてベンジルアルコールを使用すると、脱アミド化の速度に何ら影響しないように思われる。

文献：

- 1) Y.-C.J. Wang and M.A. Hanson. Parenteral Formulations of Proteins and Peptides: Stability and Stabilizers. J. Parenteral Science and Technology 42 (Suppl.) (1988) 53-525.
- 2) M.C. Manning, K. Patel, R.T. Borchardt. Stability of Protein Pharmaceuticals. Pharmaceutical Research 6 (11) (1989) 903-918.
- 3) B.A. Johnson, J.M. Shirokawa, W.S. Hancock, M.W. Spellman, L.J. Basa and D.W. Asward. J. Biol. Chem. 264, 1462-71 (1989).
- 4) L.C. Teh et al., J. Biol. Chem., 262, 785-794 (1987).
- 5) G.W. Becker et al., Biotech. Appl. Biochem., 10, 326-337 (1988).
- 6) R.A. Houghten et al., Arch. Biochem. Biophys., 178, 350-355 (1977).
- 7) R.M. Riggan et al., Anal. Biochem. 167, 199-209 (1987).
- 8) P. Gellerfors et al., Acta Paediatr. Scand (suppl), 370, 93-100 (1990).
- 9) M.J. Kaufman, Pharm. Res., 7 (3) 289-292 (1990).

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DK 95/00410

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC6: A61K 38/27

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC6: A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

SE,DK,FI,NO classes as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CA, WPIL, CLAIMS, WPAT, USPM

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0303746 A1 (INTERNATIONAL MINERALS AND CHEMICAL CORPORATION), 22 February 1989 (22.02.89), see claims --	1-14
Y	EP 0106608 A2 (THE GREEN CROSS CORPORATION), 25 April 1984 (25.04.84), see claims --	1-14
A	WO 9319776 A1 (KABI PHARMACIA AB), 14 October 1993 (14.10.93), whole document --	1-14
A	WO 9312812 A1 (NOVO NORDISK A/S), 8 July 1993 (08.07.93), whole document --	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"B" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" documents referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" documents published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document: member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 January 1996

Date of mailing of the international search report

02-02-1996

Name and mailing address of the ISA/

Swedish Patent Office

Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM

Facsimile No. +46 8 666 02 86

Authorized officer

Carolina Gómez Lagerlöf

Telephone No. +46 8 782 25 00

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DK 95/00410

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Dialog Information Services, file 351, DERWENT WPI, Dialog accession no. 007545021, WPI accession no. 88-178953/26, TEIJIN KK: "Powder compsn. for nasal admin. - comprises polypeptide(s), basic aminoacid(s) as absorption accelerators and solid base with water absorption properties", & JP, A, 63115821, 880520, 8826 (Basic) --	1-14
A	Pharmaceutical Research, Volume 6, No 11, 1989, Mark C. Manning et al, "Stability of Protein Pharmaceuticals", see especially page 903 -----	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DK 95/00410

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(s) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 15
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
See PCT Rule 39.1(iv): Methods for treatment of the human or animal body by surgery or therapy, as well as diagnostic methods
2. ☒ Claims Nos.: 16
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
The claim do not define the matter for which protection is sought.
The claim is not clear and concise (see art 6.)
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

05/01/96

International application No.

PCT/DK 95/00410

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A1- 0303746	22/02/89	SE-T3- 0303746 HU-A- 44706	28/04/88
EP-A2- 0106608	25/04/84	JP-C- 1877439 JP-B- 3078373 JP-A- 59067228 US-A- 4565651	07/10/94 13/12/91 16/04/84 21/01/86
WD-A1- 9319776	14/10/93	NONE	
WD-A1- 9312812	08/07/93	AU-A- 3344693 BG-A- 98806 CA-A- 2125855 CN-A- 1096222 CZ-A- 9401507 EP-A- 0618807 FI-A,D- 942906 HU-A- 69402 HU-D- 9401832 JP-T- 7502516 NO-A,D- 942300 ZA-A- 9209825	28/07/93 28/02/95 08/07/93 14/12/94 18/01/95 12/10/94 17/06/94 28/09/95 00/00/00 16/03/95 19/08/94 23/06/93

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M
C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG
, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN,
TD, TG), AP(KE, MW, SD, SZ, UG),
AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, C
Z, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KE, KG
, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD,
MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, R
U, SD, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA
, UG, US, UZ, VN